

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-507210

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)8月10日

(51)Int.Cl.*
C 12 P 21/08
C 07 K 16/26
G 01 N 33/53
I C 12 N 15/02

識別記号
9161-4B
8318-4H
D 7055-2J

F I

9281-4B C 12 N 15/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 6 頁) 最終頁に続く

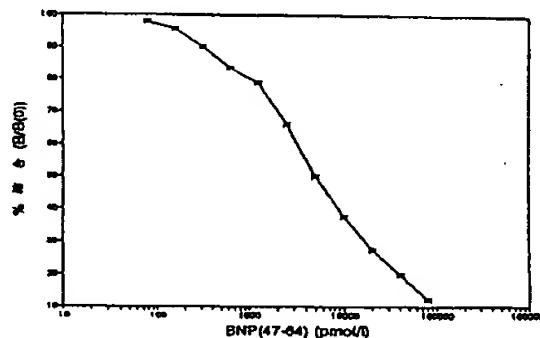
(21)出願番号 特願平6-500364
(86) (22)出願日 平成5年(1993)6月2日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)12月2日
(86)国際出願番号 PCT/GB93/01173
(87)国際公開番号 WO93/24531
(87)国際公開日 平成5年(1993)12月9日
(31)優先権主張番号 9211686.2
(32)優先日 1992年6月3日
(33)優先権主張国 イギリス(GB)
(81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71)出願人 メディノーヴァ エスエフ
ノールウェー オスロ エヌ-0027 リク
スホスピタレート
(72)発明者 ホール, クリストアン
ノールウェー スナローワ 1335 フュル
ストリア 258
(74)代理人 弁理士 鈴木 俊一郎

(54)【発明の名称】 BNP抗体およびこれを用いる免疫アッセイ

(57)【要約】

本発明は、N-末端脳ナトリウム排泄増加因子のアミノ酸1-76、即ちBNP(1-76)を含むポリペプチドに特異的な抗体である、免疫アッセイ方法に使用するための抗体を提供する。また、BNP(1-76)が診断上または予知上の指示物である場合の状態、例えば心不全または血量増加症を診断または予知するための方法およびキットを提供する。



特表平7-507210 (2)

1. β -末梢器ナトリウム誤差増加因子のアミノ酸 1-76、即ち BMP(1-76) を含むポリペプチドに特異的な抗体である、免疫アッセイ方法に使用するための抗体。
2. モノクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。
3. ポリクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。
4. 原理を有する、請求項1～3の何れかに記載の抗体。
5. 前記の標識が、放射性核種、蛍光性物質、酵素、色素または着色粒子である、請求項1に記載の抗体。
6. 固定化された形態にある、請求項1～5の何れかに記載の抗体。
7. BMP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはそのポリペプチド延長物に対する第1結合性パートナーが、請求項1～6の何れかに記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、BMP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはそのポリペプチド延長物の免疫アッセイ方法。
8. 前記の抗体が、マイクロタイタープレート、膜またはビーズに固定化されている、請求項7に記載の方法。
9. BMP(1-76)に対する第2抗体をサンドイッチアッセイにおいて用い、この抗体を BMP(1-76)との反応前または反応後に標識する、請求項7に記載の方法。

は予知する方法。

10. BMP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物を、所望により免疫原性のタンパク質またはポリペプチドに結合して、宿主動物に注射し、ポリクローナル抗体を含有する血清を提供するか、あるいは次いでハイブリドーマに変えられる脾腫細胞、またはモノクローナル抗体を産生する永続化セルラインを提供することからなる、請求項1に記載の抗体の製造方法。

10. 被分析物溶液に、標識された BMP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の既知量を加え、そして BMP(1-76)に対する固定化抗体の固定量と接触させて競合的結合アッセイを提供する、請求項9に記載の方法。
11. 標識された BMP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物。
12. 1つまたはそれ以上の免疫原性ポリペプチドに結合された BMP(1-76)あるいはその免疫原性フラグメントまたは BMP(1-76)の少なくとも1つのエピトープを有するそのポリペプチド延長物。
13. 少なくとも
- (a) 固定化された形態の、本発明のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む、所望により：
 - (b) BMP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の標識されたサンプル；
 - (c) 固定化されていない形態の前記のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体；
 - (d) 前記の抗体(c)に特異的な標識された第2抗体を含む、BMP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の免疫アッセイ用キット。
14. BMP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の濃度が診断上または予知上の指標である場合に、患者の体液をインピトロで免疫アッセイすることにより、体液中の BMP(1-76)の存在またはその量を検出またはアッセイすることからなる、前記のような状態を診断または

明 紹 問

BMP抗体およびこれを用いる免疫アッセイ

本発明は、脳ナトリウム誤差増加ペプチドプロホルモン (Brain Natriuretic Peptide Prohormone) の β -末梢セクション、即ち BMP(1-76)、およびこれに対する抗体を、生物学的研究の目的で、また医学的診断、例えば心不全または血圧増加症を診断する目的で、生物液の免疫アッセイに使用する方法に関する。

心不全は、特に成人における一般的な臨床上の疾患群である。人口調査によれば、この状態は西欧諸国の総人口の約2%を占めていることが示されている。この症候群は、通常、特徴的な症状、例えば運動時呼吸困難、疲労および持続時間を持つ進行性呼吸困難を呈する。確實に診断するために、医師は通常、彼の臨床的経験を頼りにするか、あるいは超音波心臓動脈診断法、放射性核種造影法、運動試験またはカテーテル法について、患者を心臓病学センターに送らなければならない。

心疾患は、多くの主要な国々における健康費用の重大な損失を抱しており、初期の診断は、病状を制御するために、かつ重複な心不全に進行するのを防止するために投石つであらうが、心不全が起こりそうなこれらの患者を、心不全が実際に起こる前に特定できること、即ち前よりは予知できることが肝要しあることは、明らかであらう。

既全ながら、現在のところ、心不全の可能性を予知するための完全に満足すべき方法はない。このような方法に関してしばしば問題される問題は、精度および感度が不充分であることであり、また、特別に標識された器具（例えば超音波心臓診断写真の場合）が必要な高価な装置を必要とする点で不利なことがある。従って、正確にかつ高感度で、心不全の発病を診断できるのみならず、心不全が発病する可能性をも予知できる簡単な方法に対する要望がある。

心不全は、徴候的な状態、即ち明白な病気または症候群と対応することができるが、患者はしばしば、心機能不全それ自身が現れる前に明白な症状のない

特表平7-507210 (3)

非微候的 (asymptomatic) 心臓機能不全の状態、即ち無症状の (sub-clinical) 状態を通過することがある。しかしながら、本発明者は、心臓機能不全患者の全てが覚醒心不全に進行し続けるのではないこと、また、このような人々の個人化にとては、他の人々よりも心不全の危険が常に大きいことを見出した。心不全が進行する特別な危険のある人々を、心不全が起る前に捕らえて放置できるために、これらの人々を同定できることは、臨床上の重要性が大きいだろう。現在行なわれている检测、例えば ACE 阻害剤は極めて高価であり、心不全の発現を防止しようとして检测すべき全ての人々にとって、価格などには有効でない。

βナトリウム荷担増加ペプチド (BNP) は、初めは T. Sudoh および共同研究者によってブタ脳から単離されたポリペプチドである (Nature 1988; 332: 78-81)。このペプチドをコードする cDNA のクローニングおよび配列分析 (T. Sudoh BBRC 1989; 159: 1427-34) の後、BNP はヒト心臓において産生されることが示された。ヒト βナトリウム荷担増加ペプチドは、心筋細胞中でプロカルモン (proBNP または BNP(1-108)) として産生されると信じられている。proBNP は、108 個のアミノ酸からなり、分断の前まではその間に、アミノ酸 Arg76 -- Ser77 において開裂して、BNP と、BNP(1-76) となり、この BNP(1-76) は、proBNP の N-末端からの最初の 76 個のアミノ酸からなるペプチドである。

BNP(77-108) の血漿濃度は、心臓病患者において増加し、心不全を示す。心筋細胞は他の因子、即ち心房ナトリウム荷担増加因子 (ANP) を分泌するが、心不全または初期心不全に対する分泌応答は、ANP 系と比較して、BNP 系において遙に大きいようである (Mukoyama et al, J Clin Invest 1991; 87: 1402-12)。

本発明は、BNP(1-76) が、BNP ホルモン自体と比較して半減期が長く、かつ感受度が高いため、心臓病を示す血漿増加症の診断上の特に良好な指示物または予知物であるという概念に基づいている。

従って BNP(1-76) は、心不全の診断試験または予知試験の基準を提供する

ために、本来このような試験用の抗体の生物合成に使用できるだけでなく、競合的結合性免疫アッセイにおける競合性抗原としても使用することができる。抗体を作成する際にこのように使用するためには、BNP(1-76) またはそのフラグメントを、有利には、免疫原性のタンパク質またはペプチド、例えばツベルクリンのタンパク質調製体である FPPD、オオガイヘモシアン (Keyhole Limpet Haemocyanin) またはウシ血清アルブミンと結合させることができる。

従って、1つまたはそれ以上の免疫原性ポリペプチドに結合された BNP(1-76) あるいはその免疫原性フラグメントまたは BNP(1-76) の少なくとも1つの抗原性エピトープを有するそのポリペプチド延長物は、本発明の一つの基盤を構成する。これらのポリペプチドは、BNP(1-76) に特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の作成に用いることができる。このようなモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、本発明のもう二つの基盤を構成する。

本発明の更にもう一つの基盤によれば、BNP(1-76) あるいはその免疫原性フラグメントまたは BNP(1-76) の少なくとも1つの抗原性エピトープを有するそのポリペプチド延長物についての免疫アッセイ方法が提供され、この場合、その第1結合性パートナーは、本発明のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。免疫アッセイ方法は、この技術分野でよく知られていることは言うまでもなく、例えば RIA、ELISA、蛍光免疫アッセイ (FIA) または化学試験ストリップ免疫アッセイである。このような免疫アッセイでは、一般的に、本発明のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が、例えばマイクロタイタープレート、膜またはビーズに固定化された形で用いられ、標的の BNP(1-76) 化合物が単離される。サンドイッチアッセイでは、結合した抗原を、本発明の可溶性抗体を更に用いて標識することができ、この可溶性抗体は、モノクローナル性でもポリクローナル性でもよく、標識を有していてもよく、または更に好都合には、標識を有する第2抗体との反応によって、後でそれを自己を標識することもある。

従って、本発明の第1抗体がマウスまたはウサギにおいて産生されたもので

あるならば、標識された第2抗体は、猿-マウス抗体または猿-ウサギ抗体であってよい。

・好適な標識としては、放射性同位素、蛍光性物質、例えばヨウロピウムを基盤とする免疫性物質、酵素、例えば馬鈴薯ハイブリッド化酵を用いる ELISA 系に使用されるような酵素、あるいは色素または着色粒子、例えばコロイド状態などがある。

あるいは、競合的結合アッセイを用いることもでき、この場合は、標識された BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたは延長物の既知量を、被分析物 (analyte) の倍数に加え、固定化モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の固定量と接触させ、これによって、固定化された (反応した) 標識抗原の量は、被分析物中に存在する標的抗原の量に反比例する。

従って本発明は、BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の標識された形態、および本発明の抗体の標識された形態にまで拡張される。

本発明はまた、少なくとも

(a) 固定化された形態の、本発明のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む、所要により：

(b) BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の標識されたサンプル；

(c) 固定化されていない形態の上記のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体；

(d) 上記の抗体(c) に特異的な標識された第2抗体

を含む、BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたはそのポリペプチド延長物の免疫アッセイ用キットを包含する。

このような免疫アッセイおよびキットは、関連する生物学的システムの研究において、並びに体液中の BNP(1-76) レベルが診断上または予知上の指示物である場合の状態を診断または予知するために使用することができる。

本発明はまた、BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延

長物の濃度が診断上または予知上の指示物である場合に、患者の体液をインピトロで免疫アッセイすることにより、体液中の BNP(1-76) の存在またはその量を検出またはアッセイすることからなる、上記のような状態を診断または予知する方法をも包含する。

本発明者は最近、他のナトリウム荷担増加因子、即ち pro-ANP および特に β-末梢 pro-ANP を、心不全の明白な徵候のない患者における心不全の危険の指標物として使用できることを見出した。体液中の pro-ANP レベルは、心不全の危険に直接に関連づけることができ、主として高められた心房圧に関連づけることができる。これとは対照的に、BNP(1-76) は、そのフラグメントまたはポリペプチド延長物として、実際の心不全の診断に使用できるのに加えて、心不全の危険を評価するためにも使用することができる。更に、体液中の β-末梢 pro-ANP および BNP(1-76) の両者のアッセイは、心房圧または心室圧のどちらに関するのかを決定するのに役立つことができる。

従って、免疫アッセイは、心不全危険の監視に使用することができる。このような危険は、心不全に見られる血量増加および過剰な血管収縮を、利尿剤および血管拡張薬の投与によって減少させることを目的としている。このような危険は、心室圧の低下によって BNP(1-76) の心臓での産生を低下させるであろう。導かれる危険 BNP(1-76) 濃度の低下は、医師に薬剤の有効な効果を知らせるのに役立つ。その反対に、血量 BNP(1-76) の上昇は、用量の調節が必要であるかもしれないことを示す。

現時点では文献に充分に記載されてはいないが、BNP(1-76) は、心不全を伴わない血量増加の診断における診断手段としても使用することができる。このための免疫アッセイは、血量状態の監視が不可欠な病院内集中治療の確立においても使用できる可能性を有している。

免疫アッセイが行なわれる体液は、BNP(1-76) が単離される任意の体液であってよいが、血漿または血清が好都合であろう。幾つかの場合には、ペプチドを抽出するか、あるいはアッセイの前にサンプルを処理することが好都合なこ

特表平7-507210 (4)

Biochem 1986; 156: 220-222) に従って、PPD(ツベルクリンのタンパク質前導体)に結合させた。

2) 免疫感作

BCG 乾原で前免疫感作した Balb C マウスを用いた。これらのマウスに、フロイド不完全アジュバント 200 μ l 中の上記 3 種の結合物の混合物 50 μ g を投与した。この混合物は、2 時間の間隔で 2 回、 $2 \times 200 \mu$ l の注射として与えた。最後の注射から 2 週間後に、食塩水中の結合物の混合物 50 μ g を腹腔内に注射した。

3) 褐色

腹腔内免疫感作から 3 日後に、マウスの脾臓細胞を BP 2/0 骨髓細胞と融合させ、得られたハイブリドーマを HAT 培地において選択した。ハイブリドーマの培養液を、10 l のヒト内皮細胞上皮液に含ませた 360 級のウェル中のグルベッコ培地に移した。

4) スクリーニング

方法 1

Costar マイクロタイタープレートを、合成 BNP ベプチド配列の混合物 (0.5 μ g/ml) で被覆した。次いで上塗ろ液を加え、上塗ろ液からの抗体の結合を、ELISA により、ホースラディッシュペーオキシダーゼ酵素に結合したウマウス IgG の添加に次いで基質溶液 (OPD) を添加して、スクリーニングした。

方法 2

スクリーニングのもう一つの方法は、Greiner マイクロタイタープレートを、ウサギマウス IgG (1.0 μ g/ml) で被覆することである。次いで上塗ろ液を加え、インキュベートする。ビオテニル結合合成 BNP ベプチド配列を加え、上

とがある。

BNP(1-76) もあるいはその抗原性または免疫原性フラグメントは、この分野でよく知られている技術を用いて、その構成アミノ酸から合成することにより、または予備合成されたアミノ酸ブロックを組成することにより製造することができる。標識された材料が必要な場合には、標準的な技術によって標識を導入することができる。

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を産生させる目的で、例えば 1-エチル-3-(3-ジメチル-アミノプロピル)カルボキシミドを用いて、Staros et al の方法 (Analyte Biochem 1986; 156: 220-222) に従って、BNP(1-76) またはそのフラグメントを、免疫原性のタンパク質またはペプチド、例えばツベルクリンのタンパク質前導体 PPD に結合させることができる。

本発明の抗体は、宿主動物、例えばマウスまたはウサギに、本発明の BNP 抗原、有利には前記のように免疫原性タンパク質に結合した抗原を注射して、ポリクローナル抗体を含有する血清を提供するか、あるいはハイブリドーマに誘導するための脾臓細胞、またはモノクローナル抗体を産生する永続化セルライズを提供することによって作成することができる。

下記の実施例は、添付の図面を参照して説明するためにだけ記載する。

図 1 は、免疫原、標的物およびトレーサーとして合成 BNP(47-64) を用い、またポリクローナルウサギ抗体を用いる BNP(1-76) の免疫アッセイのための標準曲線を示す。(底座値は BNP(47-64) pmol/l を示し、底座値は未結合 (B/O) を示す。)

実施例 1

BNP(1-76) に対するモノクローナル抗体の製造

1) 結合

BNP(1-76) の 3 つの合成フラグメント: BNP(1-21)、BNP(22-46) および BNP(47-64) は、Peninsula 研究所から得られ、Staros et al (Analyte

組み液がペプチドに結合する能力を、ELISA により、ストレプタビシン (streptavidin) に結合したホースラディッシュペーオキシダーゼ酵素の添加に次いで基質溶液 (OPD) を添加して、スクリーニングする。

5) クローニング

ペプチド混合物に対する抗体を産生するハイブリドーマを、2 系列でクローニングおよび世代クローニングした。クローン 1C7 は、ペプチド配列 BNP(47-64) との反応を示した。このクローンを生育させ、上塗ろ液を BNP(1-76) の免疫アッセイに使用した。

実施例 2

BNP(1-76) の免疫アッセイ

1C7 抗体は、BNP(1-76) の種々のタイプの免疫アッセイに使用することができます。これらの免疫アッセイとしては、

- 放射性免疫アッセイ (RIA)
- ユーロビーム蛍光免疫アッセイ (FIA)
- マイクロタイタープレートまたは膜において行なわれる自家ハイブリッド法を含む酵素結合免疫ソーベントアッセイ (ELISA)
- 種々の乾式-化学試験ストリップ免疫アッセイ

が挙げられる。

下記にサンダイッチ ELISA の例を記載する。

Costar マイクロタイタープレートを、1C7 抗体で前被覆する。サンプルまたは標準物をウェルに加え、2 時間インキュベートした後、ウェルを洗浄し、BNP(1-76) に対する第 2 抗体 (ポリクローナルまたはモノクローナル) を加える。再び 2 時間後に、ホースラディッシュペーオキシダーゼで標識したウマウス (ウサギ) 抗体を供給し、最後に、 α -フェニレンジアミン基質を加えた後、

プレートリーダーで色を読みとる。

実施例 3

ポリクローナルウサギ抗体を用いる BNP(1-76) の免疫アッセイ

BNP(1-76) の合成ペプチドサブ配列、この場合は BNP(47-64) を、Staros et al (上記) に従って PPD に結合した。ウサギに BCG ワクチンを接種し、次いで前記の結合ペプチドで繰り返し免疫感作した。

ヒ衣卵に付加したチロシン基による合成 BNP(47-64) の炭素化 (^{14}C) を、クロラミン-T 法によって、下記のようにして行なった。

クロラミン-T 法

- 5 μ g の合成ペプチドを、20 μ l の硝酸ナトリウム緩衝液 (0.25 M, pH 7.5) で再溶解した。
- 約 5 μ l の ^{14}C を加えた (0.5 mCi)。
- 5 μ l のクロラミン-T (1 mg/ml) を加え、45 秒間インキュベートした。
- 5 μ l のメタ重曹液ナトリウム (1 mg/ml) を加え、45 秒間インキュベートした。
- 次いで混合物を Sephadex G10 のカラムで分離した。
- フラクションをガムカウンターでカウントし、1 分当たりのカウント (cpm) が最高のフラクション (1 つまたは 2 つ以上) を、RIA 法に使用するためのトレーサーとして選んだ。

サンプルまたは標準物 (BNP(1-76)) を、トレーサー (炭素化 BNP(1-76)) およびウサギ血清からのポリクローナル抗体と共に、ポリスチレン板アッセイ用チューブ中で混ぜる。4°C で 48 時間インキュベートした後、ウサギからの正常血清、およびヤギ抗-ウサギ IgG を加える。2 時間インキュベートした後、ポリエチレングリコール (PEG) を加え、サンプルを遠心する。上層を

量を除去し、比表面中の1分当たりのカウント (cpm) を、ガンマカウンターで測定する。このタイプのアッセイによって得られた標準曲線の一例を、図1に示す。

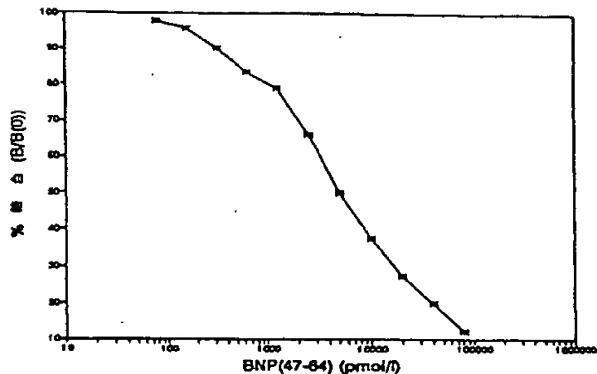


Figure 1

RELEVANT DOCUMENTS		PROGRESSIVE APPLICATION NO.	PCT/CB 93/01173
Cited by Examiner, and references, where applicable, to the relevant portions		CITED BY EXAMINER	
A	J. CLIN. INVEST., vol. 87, no. 4, April 1991, AM. SOC. CLIN. INVEST., pages 1402 - 1432 M. KOBAYASHI ET AL, "Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans" cited in the application see page 1404, left column, paragraph 6 - page 1408, right column, paragraph 2	I-15	
A	EP,A,0 285 476 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO.) 5 September 1990 see page 2, line 45 - page 3, line 3; claims 1-9		I-16

国際特許報告

GB 9101173
SA 74642

This document contains the Patent Office's administrative reference to the patent documents held in the International Bureau's International Search Report.
 These documents are not reproduced in the European Patent Office's EPO File and
 The European Patent Office is not a legal holder for these publications which are granted gratis for the purpose of information. 23/03/93

Patent Application number in International Search Report	Publication date	Patent Holder name/number	Publication date
EP-A-0185476	08-09-90	JP-A- 2231042 JP-A- 2237999	13-09-90 20-09-90

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/93

フロントページの続き

(51) Int. Cl. * 識別記号 行内整理番号 F I
 (C 12 P 21/08
 C 12 R 1:91)